



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND

MARKENAMT

Offenlegungsschrift

DE 199 36 302 A 1

⑯ Int. Cl.⁷:

C 12 M 1/34

G 01 N 33/483

DE 199 36 302 A 1

⑯ Aktenzeichen: 199 36 302.1

⑯ Anmeldetag: 2. 8. 1999

⑯ Offenlegungstag: 15. 2. 2001

⑯ Anmelder:

Fertig, Niels, 80798 München, DE; Tilke, Armin, 80802 München, DE; Behrends, Jan, 80799 München, DE; Blick, Robert, 81371 München, DE

⑯ Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE	197 53 598 C1
DE	198 27 957 A1
DE	197 44 649 A1
DE	691 14 870 T2
US	57 59 846
US	55 63 067
WO	99 51 531 A1
WO	99 26 724 A2
WO	96 13 721 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Vorrichtungen und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen

⑯ Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen. Die Erfindung zeichnet sich aus durch einen Biochip, in dem wenigstens eine Öffnung zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Biochips zur Untersuchung von Ionenkanälen, mit einem Substrat, in dem wenigstens eine Öffnung zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist, mit den Schritten: Vorsehen eines Substrats aus einem Halbleitermaterial, Abscheiden einer isolierenden Schicht auf der ersten Seite des Substrats, Ätzen eines Fensterabschnitts von der anderen Seite des Substrats her, und Ausbilden jeder Öffnung in dem Fensterabschnitt. Darüber hinaus schafft die Erfindung eine Meßsonde, umfassend einen Biochip der zuvor genannten Art, ein Gläsröhrchen, das auf der Seite des Substrats vorgesehen ist, die der Seite, auf der die Membran aufbringbar ist, gegenüberliegt, wobei die dem Substrat abgewandte Öffnung des Gläsröhrchens so ausgebildet ist, daß eine Elektrode einführbar ist.

DE 199 36 302 A 1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen, insbesondere Vorrichtungen und Verfahren zur Durchführung der so genannten Patch-Clamp-Technik.

Stand der Technik

Die Untersuchung von Ionenkanälen gewinnt in jüngster Zeit immer mehr an Bedeutung. Ionenkanäle sind Membranproteine, die als schaltbare Poren für Stromfluß dienen. Insbesondere sind Ionenkanäle als kleinste erregbare biologische Strukturen die fundamentalen Schaltelemente des Nervensystems. Die Ausstattung einer Nervenzelle mit Ionenkanälen verschiedenen Typs bestimmt daher wesentlich ihre Rolle bei der Informationsverarbeitung im Gehirn. Ähnliches gilt im übrigen auch für nicht neuronale erregbare Zellen, beispielsweise für die des Herzmusels und seiner Erregungsleitungssysteme. Schaltvorgänge in Ionenkanälen werden unter anderem deshalb untersucht, um Aufschlüsse über etwaige Fehlfunktionen und deren Behebung durch Medikamente und dergleichen zu gewinnen.

Zur Untersuchung von Ionenkanälen in Zellmembranen im Hinblick auf deren Schaltvorgänge, d. h. deren Öffnungs- und Schließmechanismen, wird im Stand der Technik das Patch-Clamp-Verfahren eingesetzt. Hierzu werden sogenannte Patch-Clamp-Pipetten aus Glas verwendet. Eine derartige Pipette ist in **Fig. 5** dargestellt. Diese Pipette umfaßt eine Öffnung **59**, die ungefähr einen Durchmesser von 1 µm aufweist. Weiterhin umfaßt die Pipette einen Pipettenschaft **58**, in dem eine Elektrode **53** vorgesehen ist.

Zur Analyse eines Ionenkanals wird ein Membranfleck mittels einer derartigen mit Elektrolyt gefüllten Pipette angesaugt, so daß sich zwischen Membran und Glas ein enger Kontakt bildet. Auf diese Weise wird ein sehr hoher Abdichtwiderstand in einer Größenordnung $> 10 \text{ G}\Omega$ erhalten. Hierüber können sehr kleine Ionenströme durch die Membran bis hin zu einigen 100 fA gemessen werden.

Nachteil des bekannten Verfahrens ist allerdings, daß die Zeitskala, auf der die Öffnungs- und Schließmechanismen in Ionenkanälen ablaufen, mit der bekannten Maßanordnung aus Glaspipette, Elektrode und Verstärker nicht zugänglich ist. Dies liegt insbesondere daran, daß aufgrund der hohen Streukapazität der Glaspipette, die durch deren Geometrie bedingt ist (siehe **Fig. 5**), sowohl ein schlechtes Signal-zu-Rauschverhältnis als auch eine schlechte Zeitauflösung resultiert. So besteht für Patch-Clamp-Verfahren eine Beschränkung der Bandbreite auf unter 100 kHz.

Der Erfindung liegt demnach die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Zellmembranen zu schaffen, die ein verbessertes Signal-zu-Rauschverhältnis und eine verbesserte Zeitauflösung zeigen.

Beschreibung der Erfindung

Diese Aufgabe wird durch einen Biochip gelöst, der ein Substrat aufweist, in dem wenigstens eine Öffnung zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist.

Durch Verwendung eines derartigen Biochips kann auf den relativ langen Schaft einer Pipette, der zu der hohen Streukapazität führt, verzichtet werden. Vielmehr können von vornherein die kritischen geometrischen Parameter optimiert werden, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis

gegenüber dem Stand der Technik stark verbessert wird und demnach die Zeitauflösung erhöht wird. So lassen sich erfundungsgemäß Bandbreiten von 10 MHz bei Strömen von 1 pA realisieren.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung eines derartigen Biochips ist es, daß, bedingt durch die Geometrie des Biochips alle Rastersondenverfahren, wie AFM, SNOM, STM problemlos anwendbar sind.

Darüber hinaus können aufgrund der geometriebedingten

leichten Zugänglichkeit auch andere bildgebende Verfahren, wie beispielsweise REM, konfokale Fluoreszenzmikroskopie (auch in Kombination mit SNOM), optische Mikroskopie oder Einzelphotonendetektion eingesetzt werden.

Ein weiterer aus der geometriebedingten leichten Zugänglichkeit resultierender Vorteil ist die Möglichkeit einer chemischen und/oder mechanischen Manipulation des oder der Ionenkanäle.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung kann jede Öffnung Längen- und Breitenabmessungen aufweisen, die in einem Bereich von 10 µm bis 10 nm liegen. Hierdurch läßt sich die Anzahl der beobachteten Ionenkanäle von mehreren tausend bis zu einem einzelnen, dessen Durchmesser im Bereich von einigen nm liegt, einstellen.

Entsprechend einer anderen Weiterbildung der zuvor beschriebenen Biochips kann jede Öffnung im wesentlichen kreisförmig sein. Hierdurch kann insbesondere bei Beobachtung eines einzelnen Kanals ein vollständig symmetrischer Aufbau realisiert werden. Falls ein derartiger symmetrischer Aufbau nicht entscheidend ist, können auch andere Formen für die Öffnungsquerschnitte gewählt werden.

Gemäß einer anderen Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Biochips kann die Dicke des Substrats im Bereich jeder Öffnung in einem Bereich von 1 µm bis 50 nm liegen. In diesem Dickenbereich wird zum einen die Stabilität des Abschnitts, in dem sich die Öffnung befindet, gewährleistet. Zum anderen kann es bei zu großer Dicke Probleme mit dem Zugangswiderstand (series resistance), also dem Widerstand der Öffnung, geben.

Entsprechend einer anderen bevorzugten Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Biochips kann das Substrat einen Basisabschnitt mit einer ersten Dicke und einen im Basisabschnitt ausgebildeten Fensterabschnitt mit einer zweiten Dicke, in dem jede Öffnung vorgesehen ist, aufweisen. Insbesondere können hierbei die Dicke des Basisabschnitts in einem Bereich von 1 mm bis 100 µm und die Dicke des Fensterabschnitts in einem Bereich von 1 µm bis 50 nm liegen. Durch diese Ausbildung kann die Stabilität des Substrats weiter erhöht werden, wobei im wesentlichen Abschnitt eine Dicke gewährleistet werden kann, bei der keine Probleme mit dem Zugangswiderstand auftreten.

Vorteilhafterweise können die zuvor beschriebenen Biochips ein Substrat aufweisen, das Quarz oder Glas umfaßt. Insbesondere Quarz läßt sich sehr gut mit bekannten Ätzverfahren, beispielsweise HF-Ätzen, verarbeiten, so daß die erwünschten oben beschriebenen Strukturen auf einfache Weise erhalten werden können.

Alternativ hierzu kann das Substrat ein Halbleitermaterial und eine auf dem Halbleitermaterial aufgebrachte Isolationsschicht aufweisen, wobei die Isolationsschicht auf der Seite des Halbleitermaterials, auf der die Membran aufbringbar ist, vorgesehen ist. Zusätzlich und zur Verringerung der Gesamtkapazität des Biochips kann auch auf der anderen Seite des Substrats eine Isolationsschicht aufgebracht werden. Diese beiden Ausführungen zeichnen sich ebenfalls dadurch aus, daß sie durch aus der Halbleitertechnik bekannte Verfahren mit den oben bezeichneten bevorzugten Maßen hergestellt werden kann.

Vorzugsweise umfaßt das Halbleitermaterial hierbei Si

oder GaAs.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der zuvor beschriebenen Ausführungen kann das Substrat eine Ätzstoppschicht aufweisen, die auf der Seite des Substrats, auf der die Membran aufbringbar ist, vorgesehen ist. Hierdurch kann der Ätzschritt erheblich vereinfacht werden und die gewünschten Strukturen können mit höherer Präzision hergestellt werden.

Die Ätzstoppschicht kann dabei auch aus verschiedenen Unterschichten bestehen, die verschiedene Materialien, beispielsweise Si_3N_4 , Glas, Si, Polymere, sowie Metalle, umfassen können.

Im Fall eines Substrats, das Halbleitermaterial umfaßt, können die Isolationsschicht und die Ätzstoppschicht durch eine einzige Schicht ausgebildet sein.

Die Isolationsschicht und/oder die Ätzstoppschicht können Si_3N_x , beispielsweise Si_3N_4 , aufweisen. Mit diesem Material kann ein mit dem herkömmlichen Verfahren vergleichbarer Abdichtwiderstand von einigen GΩ der zur Messung hinreichend kleiner Ströme erforderlich ist, realisiert werden.

Die zuvor beschriebenen und durch Verfahren aus der Halbleitertechnologie herstellbaren Biochips können ein Substrat aufweisen, das im Fensterabschnitt nur die Isolationsschicht aufweist. Auch diese Anordnung zeichnet sich dadurch aus, daß sie auf besonders einfache Weise durch anisotropes Ätzen hergestellt werden kann, wie im Zusammenhang mit der Diskussion der Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Biochips noch im Detail ausgeführt wird.

Entsprechend einer anderen Weiterbildung der zuvor beschriebenen Biochips können eine oder beide Seiten des Substrats mit einer passivierenden Schicht versehen sein.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Biochips können Elektroden auf einer oder auf beiden Seiten des Substrats vorgesehen sein. Dies ermöglicht einen relativ einfachen Versuchsaufbau, da die Elektroden bereits fest auf dem Biochip integriert sind und demnach ein Anbringen und Justieren der Elektroden entfällt. Außerdem können durch eine derartige Anordnung die parasitären Kapazitäten und Widerstände weiter verringert werden, was zu einer weiteren Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führt.

Ob ein Biochip mit Elektroden auf einer oder auf beiden Seiten des Substrats zum Einsatz kommt, kann in Abhängigkeit von dem durchzuführenden Versuch bestimmt werden. Eine Anordnung mit integrierten Elektroden auf der Substratunterseite (der Seite, die der Membran abgewandt ist) eignet sich insbesondere auch zur kapazitiven Messung.

Als Elektroden eignen sich insbesondere Ag/AgCl-Elektroden. Diese Elektroden haben den Vorteil, daß ein Ausbilden von Raumladungen, die zur Verfälschung der Meßergebnisse führen können, vermieden wird.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung können diese Elektroden so ausgebildet sein, daß ein zeitlich konstantes elektrisches und/oder magnetisches (im folgenden elektromagnetisches) Feld und/oder ein hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld anlegbar ist. Insbesondere durch Anlegen eines hochfrequenten Wechselfelds im Bereich von MHz bis GHz läßt sich die Dynamik der Ionenkanäle analysieren. Zum Anlegen derartiger hochfrequenter Felder ist die Verwendung von Antennenstrukturen besonders geeignet. Hierdurch kann eine effektive Kopplung des elektromagnetischen Feldes an den Ionenkanal erzielt werden.

Entsprechend einer bevorzugten Ausbildung können die Elektroden hierbei eine Breite von 40 nm aufweisen und die Elektroden können an die Öffnung herangeführt sein.

Ebenso wie Elektroden können gemäß einer bevorzugten

Weiterbildung der zuvor beschriebenen Biochips auch elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente auf dem Substrat integriert sein. Hierdurch ergibt sich eine weitere strukturelle Vereinfachung des Versuchsaufbaus.

5 Insbesondere können so auch die Signalwege kurz gehalten werden, was insbesondere bei den kleinen zu messenden Strömen zu einer deutlichen Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führt.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform 10 enthält der Biochip genau eine Öffnung. In Abhängigkeit von der Größe der Öffnung lassen sich bis zu einem einzigen Ionenkanal untersuchen.

Entsprechend einer anderen Ausführungsform können 15 eine Mehrzahl von Öffnungen, die beispielsweise in Form eines Lochgitters angeordnet sind, vorgesehen sein. Mit einer derartigen Anordnung lassen sich gezielt (in Kombination mit ortsaufgelöster kapazitiver Messung) die Wechselwirkungen einzelner Ionenkanäle studieren.

Die Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zur Verfü- 20 gung, das auf einfache Weise eine Herstellung eines Biochips, wie er oben beschrieben worden ist, ermöglicht. Insbesondere umfaßt das Verfahren die Schritte eines Vorsehens eines Substrats, eines Ätzens eines Fensterabschnitts in dem Substrat, und eines Ausbildens jeder Öffnung in dem 25 Fensterabschnitt.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung dieses Verfahrens wird auf einer Seite des Substrats eine Ätzstoppschicht aufgebracht, und der Fensterabschnitt wird von der anderen Seite des Substrats her bis zur Ätzstoppschicht geätzt. Hier- 30 durch kann auf sehr einfache Weise eine präzise Ausbildung des Fensterbereichs erhalten werden.

Vorteilhafterweise läßt sich in den oben genannten Verfahren ein Quarzsubstrat einsetzen.

Alternativ kann ein Halbleitersubstrat, beispielsweise Si 35 oder GaAs, mit einer Isolationsschicht verwendet werden. Falls in diesem Verfahren eine Ätzstoppschicht verwendet wird, kann diese vorteilhafterweise in Form einer isolierenden Schicht vorgesehen werden, so daß keine zusätzliche Schicht erforderlich ist.

40 Vorzugsweise kann die Ätzstoppschicht und/oder die Isolationsschicht mit einem PECVD-Verfahren aufgebracht werden.

Als Ätzstoppschicht und/oder Isolationsschicht hat sich hierbei insbesondere eine Si_3N_x -Schicht, vorzugsweise eine 45 Si_3N_4 -Schicht, als günstig erwiesen.

In dem Ätzschritt gemäß dem oben bezeichneten Verfahren wird der Fensterabschnitt vorteilhafterweise durch einen anisotropen Ätzschritt ausgebildet. Bei einem Halbleiterma- 50 terial findet vorzugsweise ein KOH-Ätzschritt Einsatz, bei einem Quarz-Substrat hingegen ein HF-Ätzschritt.

Entsprechend einer bevorzugten Weiterbildung der zuvor beschriebenen Verfahren wird die Öffnung durch optische Lithographie und einen Trockenätzschritt gebildet. Dieses Verfahren eignet sich für vergleichsweise große Öffnungen.

55 Sollen kleinere Öffnungen, beispielsweise herab bis zu 10 nm vorgesehen werden, läßt sich die Öffnung beispielsweise durch Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt bilden.

Alle zuvor genannten Verfahren können dahingehend 60 weitergebildet werden, daß auf das Substrat, gegebenenfalls auf die Ätzstoppschicht, Elektroden, elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente integriert werden. In dieser Ausführung lassen sich die bereits im Zusam- 65 menhang mit den entsprechenden Biochips diskutierten Vorteile erzielen. Zur Vermeidung von Wiederholungen wird deshalb auf die entsprechende obenstehende Diskussion verwiesen.

Die eingangs genannte Aufgabe wird außerdem gelöst

durch eine Meßsonde mit einem Biochip, wie er oben beschrieben worden ist, mit einem Glaskrüppchen, das auf der Seite des Substrats vorgesehen ist, die der Seite, auf der die Membran aufbringen ist, gegenüberliegt, wobei die dem Substrat abgewandte Öffnung des Glaskrüppchens so ausgebildet ist, daß eine Elektrode einführbar ist. Hierdurch kann eine Elektrode in ionischer Lösung zur Untersuchung des oder der Ionenkanäle an die Öffnung herangeführt werden.

Eine derartige Meßsonde schafft eine Einrichtung, in welcher der oben beschriebene Biochip auf einfache Weise zur Durchführung der Analyse der Ionenkanäle integriert werden kann. Insbesondere kann diese Meßsonde auch problemlos in bekannten Patch-Clamp-Aufbauten integriert werden.

Vorteilhafterweise kann in einer solchen Meßsonde die dem Substrat abgewandte Öffnung des Glaskrüppchens so ausgebildet sein, daß eine Elektrodeneinrichtung einschraubar ist. In dieser Anordnung kann die Elektrodeneinrichtung schnell gewechselt werden und ist darüber hinaus wieder verwendbar. Diese Anordnung eignet sich unter anderem für einen Biochip, der nur Elektroden auf der Oberseite des Chips aufweist.

In dieser Weiterbildung kann die Meßsonde zweckmäßigerverweise auch zusammen mit der einschraubbaren Elektrode vertrieben werden.

In einer derartigen Anordnung sind zweckmäßigerweise zwischen der Öffnung des Glaskrüppchens und der einschraubbaren Elektrode Dichtungsmittel, beispielsweise O-Ringe, vorgesehen, damit der Elektrolyt im Glaskrüppchen verbleibt.

Vorteilhafterweise ist das Glaskrüppchen mit dem Substrat verklebt oder mit einem Dichtungsring mit dem Substrat verschraubar. Hierdurch kann eine einfache und dichte Verbindung zwischen Glaskrüppchen und Substrat sichergestellt werden. Die Verschraubung gemäß der zweiten Alternative führt zusätzlich zur Wiederverwertbarkeit der Meßsonde.

Die zuvor beschriebenen Meßsonden können vorteilhaft so weitergebildet werden, daß sie eine Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck in dem Glaskrüppchen aufweisen. Mit dieser Einrichtung kann mit der üblichen Ansaugtechnik ein Membranfleck einer ebenfalls in Lösung befindlichen Zelle definiert werden. Damit können alle zur Durchführung einer Analyse von Ionenkanälen erforderlichen Schritte an einer einzigen Vorrichtung durchgeführt werden. Dies führt zu einer verbesserten Handhabbarkeit der Vorrichtung.

Im folgenden werden besondere Ausführungsformen der Erfindung unter Bezugnahme auf die beigelegte Zeichnung erläutert. In der Zeichnung zeigen:

Fig. 1 eine erste Ausführungsform eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;

Fig. 2 eine zweite Ausführungsform des Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;

Fig. 3 eine dritte Ausführungsform des Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;

Fig. 4 eine Ausführungsform der Meßsonde gemäß der vorliegenden Erfindung; und

Fig. 5 eine Pipette zur Untersuchung von Ionenkanälen gemäß dem Stand der Technik.

In **Fig. 1** ist eine erste Ausführungsform 1 eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt.

Dieser Biochip umfaßt ein Substrat in dem eine Öffnung **19** zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist.

Das Substrat umfaßt einen Basisabschnitt **10** mit einer ersten Dicke d_1 und einen Fensterabschnitt **11** mit einer zweiten Dicke d_2 , in dem die Öffnung **19** vorgesehen ist.

Die Dicke des Basisabschnitts **10** liegt in einem Bereich

von 1 mm bis 100 μm und die Dicke des Fensterabschnitts liegt in einem Bereich von 1 μm bis 50 nm. Der Fensterabschnitt hat hierbei eine Fläche von einigen 10 μm^2 .

Die Öffnung **19** ist im wesentlichen kreisförmig und hat einen Durchmesser, der in einem Bereich von 10 μm bis 10 nm liegt. Die Größe der Öffnung bestimmt sich danach, wieviel Ionenkanäle in einer Zellmembran untersucht werden sollen.

Der Biochip **1** ist aus einem (0001)-Quarz (Z-Schnitt) gebildet, in den zunächst durch einen anisotropen naßchemischen Ätzschritt der Fensterabschnitt **11** ausgebildet wird. Als Ätzmittel wird hierbei HF verwendet.

Im letzten Schritt wird, je nach Größe der erwünschten Öffnung, diese Öffnung durch optische Lithographie und einen Trockenätzschritt oder durch Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt gebildet.

Fig. 2 zeigt eine zweite Ausführungsform eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung.

Dieser Biochip weist ebenfalls ein Substrat **20, 21**, in dem eine Öffnung **29** zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist.

Die geometrische Form und die Abmessungen des Biochips **2** entsprechen denen des in **Fig. 1** gezeigten Biochips **1**. Zur Vermeidung von Wiederholungen wird in diesem Zusammenhang lediglich auf die entsprechende Beschreibung der **Fig. 1** verwiesen. Die Bezeichnungen einander entsprechender Teile unterscheiden sich hierbei nur in ihrer ersten Ziffer.

Das Substrat des Biochips **2** umfaßt einen Basisabschnitt **20**, der ebenfalls aus Quarz gebildet ist, und eine Ätzstoppschicht, in welcher der Fensterabschnitt **21** ausgebildet ist. Diese Ätzstoppschicht besteht aus Si_3N_x , vorzugsweise Si_3N_4 .

Gegenüber dem Biochip **1** auf **Fig. 1** zeichnet sich der Biochip **2** dadurch aus, daß er durch ein vereinfachtes Verfahren herstellbar ist.

So wird auf das Substrat **20** zunächst ein Ätzstopfilm aufgebracht. Anschließend wird von der gegenüberliegenden Seite durch einen anisotropen naßchemischen HF-Ätzschritt der Fensterabschnitt **21** bis zur Ätzstoppschicht gebildet. Anschließend wird die Öffnung, vorzugsweise durch eines der im Zusammenhang mit der ersten Ausführungsform beschriebenes Verfahren, gebildet.

In **Fig. 3** ist eine dritte Ausführungsform eines Biochips **3** gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt.

Bezüglich der geometrischen Abmessungen und Aufbaus entspricht der Biochip **3** im wesentlichen dem Aufbau der in den **Fig. 1** und **2** beschriebenen Biochips, so daß auch hier zur Vermeidung von Wiederholungen auf die Beschreibung dieser Chips verwiesen wird. Die Bezeichnungen einander entsprechender Teile unterscheiden sich hierbei nur in ihrer ersten Ziffer.

Im Gegensatz zu den dort gezeigten Biochips besteht der Basisabschnitt **30** des Substrat aus einem Halbleitermaterial, beispielsweise **(100)-Si**.

Auf diesem Halbleitermaterial ist eine isolierende Schicht aufgebracht, in welcher der Fensterabschnitt **31** ausgebildet ist. Die isolierende Schicht **31** dient außerdem im Herstellungsverfahren als Ätzstoppschicht.

Der Herstellungsvorgang ist demnach dem in **Fig. 2** hergestellten Biochip ähnlich. In der dargestellten Ausführungsform besteht diese Schicht aus Si_3N_4 .

Insbesondere wird zuerst auf den Siliziumbasisabschnitt **30** die Isolations- und Ätzstoppschicht mit einem PECVD-Verfahren aufgebracht. Dann wird von der anderen Seite durch einen anisotropen naßchemischen KOH-Ätzschritt der Fensterabschnitt **31** in dem Substrat ausgebildet. Hierbei wird bis zur Ätzstoppschicht durchgeätzt. Anschließend

kann, wie in den zuvor beschriebenen Ausführungsformen in Abhängigkeit von der erwünschten Größe der Öffnung diese durch optische Lithographie bzw. Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt ausgebildet werden.

Im letzten Schritt werden schließlich noch Elektroden **32** und **33**, die im vorliegenden Fall aus Ag/AgCl bestehen, auf die Oberseite und die Unterseite des Substrats aufgebracht.

In **Fig. 3** ist darüber hinaus dargestellt, wie eine Membran **M** mit einem Ionenkanal **I** in die Öffnung **39** eingebracht worden ist. Zur anschließenden Messung, die unter Bezugnahme auf **Fig. 4** noch im Detail beschrieben wird, muß eine Elektrolytlösigkeit **34** über Membran und Elektrode **32**, sowie im Ätzgraben, vorgesehen werden.

Die in den **Fig. 1** bis **3** dargestellten Biochips stellen lediglich bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung dar, und sind nicht als Beschränkung derselben zu verstehen.

Demgemäß sind eine Vielzahl anderer, nicht gezeigter Ausführungsformen möglich.

Beispielsweise ist es nicht erforderlich, daß die Öffnung kreisförmig ausgebildet ist. Sie kann je nach Anforderung verschiedene Querschnitte aufweisen.

Außerdem lassen sich verschiedene Materialien zur Ausbildung der Biochips einsetzen. So kann beispielsweise anstelle des Quarzes auch Glas und anstelle des Silizium ein anderes Halbleitermaterial, beispielsweise GaAs, verwendet werden.

Insbesondere im Fall eines Substrats aus Halbleitermaterial, allerdings nicht beschränkt hierauf, können die Oberflächen des Substrats mit einer passivierenden Schicht überzogen werden.

Weiterhin lassen sich auch verschiedenartige Elektroden einsetzen, beispielsweise solche, die zur Erzeugung eines elektromagnetischen Feldes im Bereich des Ionenkanals geeignet sind.

Darüber hinaus können elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente auf dem Substrat integriert werden.

Ebenso lassen sich zur Herstellung der Biochips verschiedene aus der Halbleitertechnologie hinreichend bekannte Verfahren in Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten Materialien einsetzen.

Auch können mehrere Öffnungen vorgesehen werden, die beispielsweise in Form eines Lochgitters angeordnet sind.

In **Fig. 4** ist eine Meßsonde gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dargestellt.

Diese Meßsonde umfaßt ein Substrat mit einem Basisabschnitt **40** und einem Fensterabschnitt **41**, in dem eine Öffnung **49** ausgebildet ist. Auf dem Substrat ist weiterhin eine erste Elektrode **42** angeordnet.

Unter dem Substrat **40** ist ein Glasrörchen **45** befestigt, an das sich eine Elektrode **43** mit Halterung anschließt.

Weiterhin umfaßt die Meßsonde eine Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck in dem Glasrörchen, die durch das Bezugszeichen **46** angedeutet ist.

Neben der dargestellten Ausführungsform der Meßsonde, die nicht als Beschränkung der vorliegenden Erfindung zu verstehen ist, sind weitere Abwandlungen möglich.

Als Biochips lassen sich beispielsweise beliebige der erfundungsgemäßen Biochips einsetzen. Insbesondere die Abmessungen bestimmen sich hierbei nach dem Einsatzgebiet, also insbesondere der Zahl der zu untersuchenden Kanäle.

Das Glasrörchen kann beispielsweise mit dem Substrat verklebt werden.

Die Elektrodeneinrichtung mitsamt Halterung kann so ausgebildet werden, daß sie von unten in das Glasrörchen einschraubbar ist.

Weiterhin kann zwischen der Öffnung des Glasrörchens und der einschraubbaren Elektrode ein Dichtungsring vor-

gesehen sein.

Im folgenden wird beschrieben, wie mit der vorliegenden Meßsonde Ionenströme durch den Ionenkanal gemessen werden können.

5 Zunächst wird eine Zellmembran in Elektrolytlösung auf das Substrat aufgebracht. Durch Betätigung der Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck **46** wird die Membran mitamt dem Ionenkanal in die Öffnung gesaugt. In der Meßsonde befindet sich ebenfalls eine Elektrolytlösung **44**. Über die beiden Elektroden **42** und **43** kann schließlich der durch den Ionenkanal fließende Strom gemessen werden.

Patentansprüche

1. Biochip (**1; 2; 3**), insbesondere zur Untersuchung von Ionenkanälen, mit einem Substrat (**10; 20; 30**), in dem wenigstens eine Öffnung (**19; 29; 39**) zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal (**I**) umfassenden Zellmembran (**M**) vorgesehen ist.
2. Biochip nach Anspruch 1, in welchem jede Öffnung Längen- und Breitenabmessungen aufweist, die in einem Bereich von 10 µm bis 10 nm liegen.
3. Biochip nach Anspruch 2, in welchem jede Öffnung im wesentlichen kreisförmig ist.
4. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem die Dicke des Substrats im Bereich jeder Öffnung in einem Bereich von 1 µm bis 50 nm liegt.
5. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem das Substrat einen Basisabschnitt (**10; 20; 30**) mit einer ersten Dicke (d_1) und einen im Basisabschnitt ausgebildeten Fensterabschnitt (**11; 21; 31**) mit einer zweiten Dicke (d_2), in dem jede Öffnung vorgesehen ist, aufweist.
6. Biochip nach Anspruch 5, in welchem die Dicke des Basisabschnitts in einem Bereich von 5 nm bis 10 µm, vorzugsweise von 1 mm bis 100 µm, liegt, und die Dicke des Fensterabschnitts in einem Bereich von 10 µm bis 10 nm, vorzugsweise von 1 µm bis 50 nm, liegt.
7. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem das Substrat (**10; 20**) Quarz oder Glas umfaßt.
8. Biochip nach einem der Ansprüche 1 bis 6, in welchem das Substrat (**30**) ein Halbleitermaterial und eine auf dem Halbleitermaterial aufgebrachte Isolationsschicht (**31**) aufweist.
9. Biochip nach Anspruch 8, in welchem das Halbleitermaterial Si oder GaAs umfaßt.
10. Biochip nach einem der Ansprüche 7 bis 9, in welchem das Substrat eine Ätzstoppsschicht (**21; 31**) umfaßt, die auf der Seite des Substrats, auf der die Membran aufbringbar ist, vorgesehen ist.
11. Biochip nach Anspruch 10 in Verbindung mit Anspruch 8, in welchem die Isolationssschicht und die Ätzstoppsschicht durch eine einzige Schicht ausgebildet sind.
12. Biochip nach Anspruch 11, in welchem die Isolationssschicht und/oder die Ätzstoppsschicht Si_3N_x , vorzugsweise Si_3N_4 , aufweist.
13. Biochip nach einem der Ansprüche 7 bis 12 in Verbindung mit Anspruch 5 oder 6, in welchem das Substrat im Fensterabschnitt nur die Isolationssschicht und/oder die Ätzstoppsschicht aufweist.
14. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem eine oder beide Seiten des Substrats mit einer passivierenden Schicht überzogen sind.
15. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprü-

che, in welchem Elektroden auf einer oder auf beiden Seiten des Substrats vorgesehen sind.

16. Biochip nach Anspruch 15, in welchem die Elektroden so ausgebildet sind, daß ein zeitlich konstantes elektromagnetisches Feld und/oder ein hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld anlegbar ist. 5

17. Biochip nach Anspruch 16, in welchem die Elektroden eine Breite von etwa 40 nm haben und an die Öffnung herangeführt sind.

18. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem aktive und/oder passive Bauelemente 10 auf dem Substrat integriert sind.

19. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem genau eine Öffnung vorgesehen ist.

20. Biochip nach einem der Ansprüche 1 bis 18, in 15 welchem eine Mehrzahl von Öffnungen, die in Form eines Lochgitters angeordnet sind, ausgebildet ist.

21. Verfahren zur Herstellung eines Biochips zur Untersuchung von Ionenkanälen, mit einem Substrat, in dem wenigstens eine Öffnung zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist, mit den Schritten: 20

Vorsehen eines Substrats,

Ätzen eines Fensterabschnitts in das Substrat, und 25 Ausbilden jeder Öffnung in dem Fensterabschnitt.

22. Verfahren nach Anspruch 21, in welchem eine Ätzstoppschicht auf eine Seite des Substrats aufgebracht wird, und der Fensterabschnitt von der anderen Seite des Substrats her bis zur Ätzstoppschicht geätzt wird. 30

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, in welchem ein Quarzsubstrat verwendet wird.

24. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, in welchem ein Substrat aus einem Halbleiter, vorzugsweise Si oder GaAs, mit einer Isolationsschicht verwendet wird. 35

25. Verfahren nach Anspruch 24 in Verbindung mit Anspruch 22, in welchem die Isolationsschicht und die Ätzstoppschicht in Form einer Schicht vorgesehen werden.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, in 40 welchem die Isolationsschicht und/oder die Ätzstoppschicht mit einem PECVD-Verfahren aufgebracht wird.

27. Verfahren nach Anspruch 26, in welchem die Isolationsschicht und/oder die Ätzstoppschicht aus Si_3N_x , 45 vorzugsweise Si_3N_4 , gebildet wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche Anspruch 21 bis 27, in welchem der Fensterabschnitt durch einen anisotropen Ätzschritt ausgebildet wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28 in Verbindung mit 50 Anspruch 23, in welchem der anisotropen Ätzschritt ein HF-Ätzschritt ist.

30. Verfahren nach Anspruch 28 in Verbindung mit Anspruch 24, in welchem der anisotropen Ätzschritt ein KOH-Ätzschritt ist. 55

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 30, in welchem die Öffnung durch optische Lithographie und einen Trockenätzschritt gebildet wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 30, in 60 welchem die Öffnung durch Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt gebildet wird.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 32, in welchem auf die Ätzstoppschicht Elektroden, elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente integriert werden. 65

34. Meßsonde (4), umfassend einen Biochip (1; 2; 3) nach einem der Ansprüche 1 bis 20,

ein Glasröhrenchen (45), das auf der Seite des Substrats vorgesehen ist, die der Seite, auf der die Membran (M) aufbringbar ist, gegenüberliegt, wobei die dem Substrat abgewandte Öffnung des Glasröhrenchens so ausgebildet ist, daß eine Elektrodeneinrichtung (43) einführbar ist.

35. Meßsonde nach Anspruch 34, in welcher das Glasröhrenchen mit dem Biochip verschraubbar ist.

36. Meßsonde nach einem der Anspruch 35, in welcher zwischen Glasröhrenchen und Biochip Dichtungsmittel vorgesehen sind.

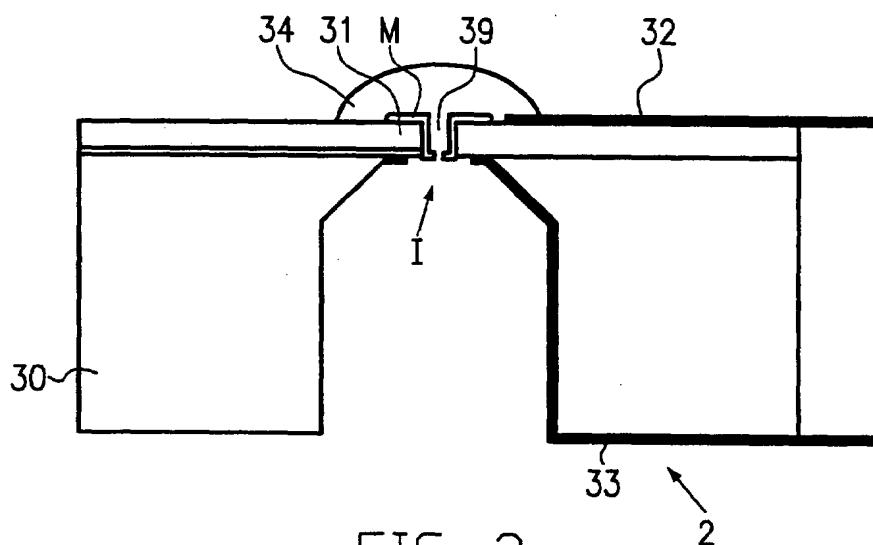
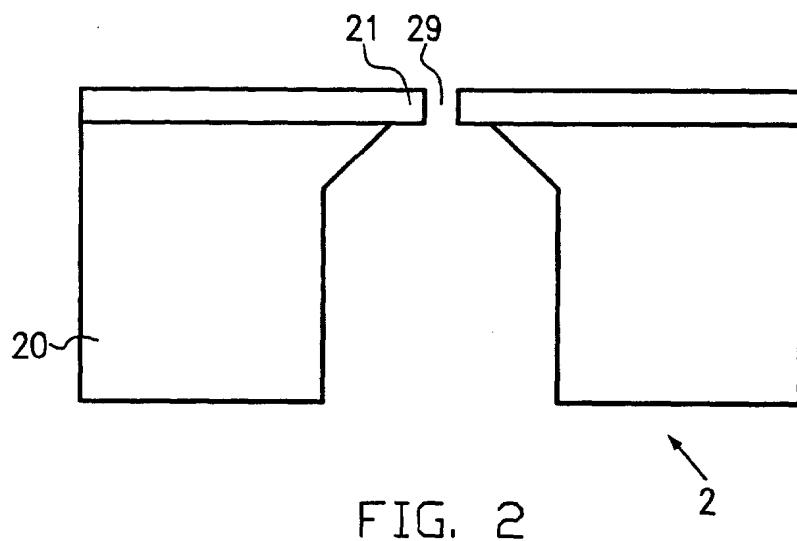
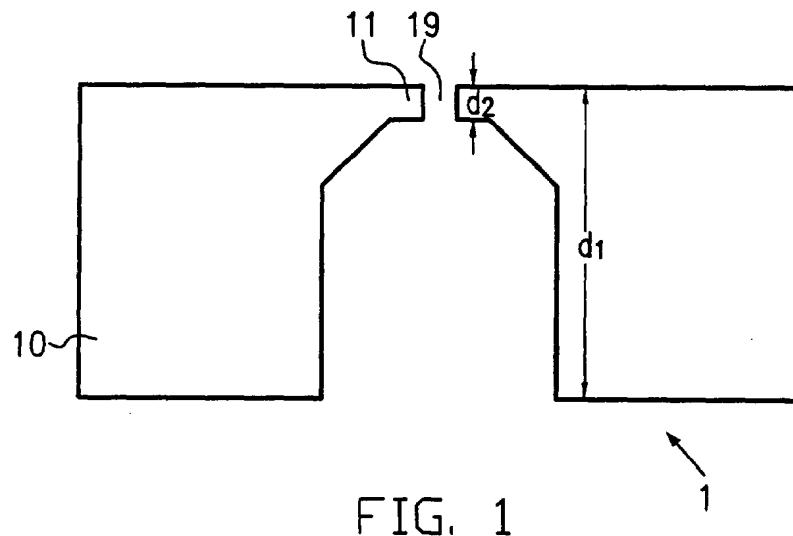
37. Meßsonde nach Anspruch 34, in welcher das Glasröhrenchen mit dem Substrat verklebt ist.

38. Meßsonde nach einem der Ansprüche Anspruch 34 bis 37, in welcher die Elektrodeneinrichtung in das Glasröhrenchen einschraubbar ist.

39. Meßsonde nach Anspruch 38, in welcher zwischen Glasröhrenchen und Elektrodeneinrichtung Dichtungsmittel vorgesehen sind.

40. Meßsonde nach einem der Ansprüche 34 bis 39, in welcher eine Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck (46) in dem Glasröhrenchen vorgesehen ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen



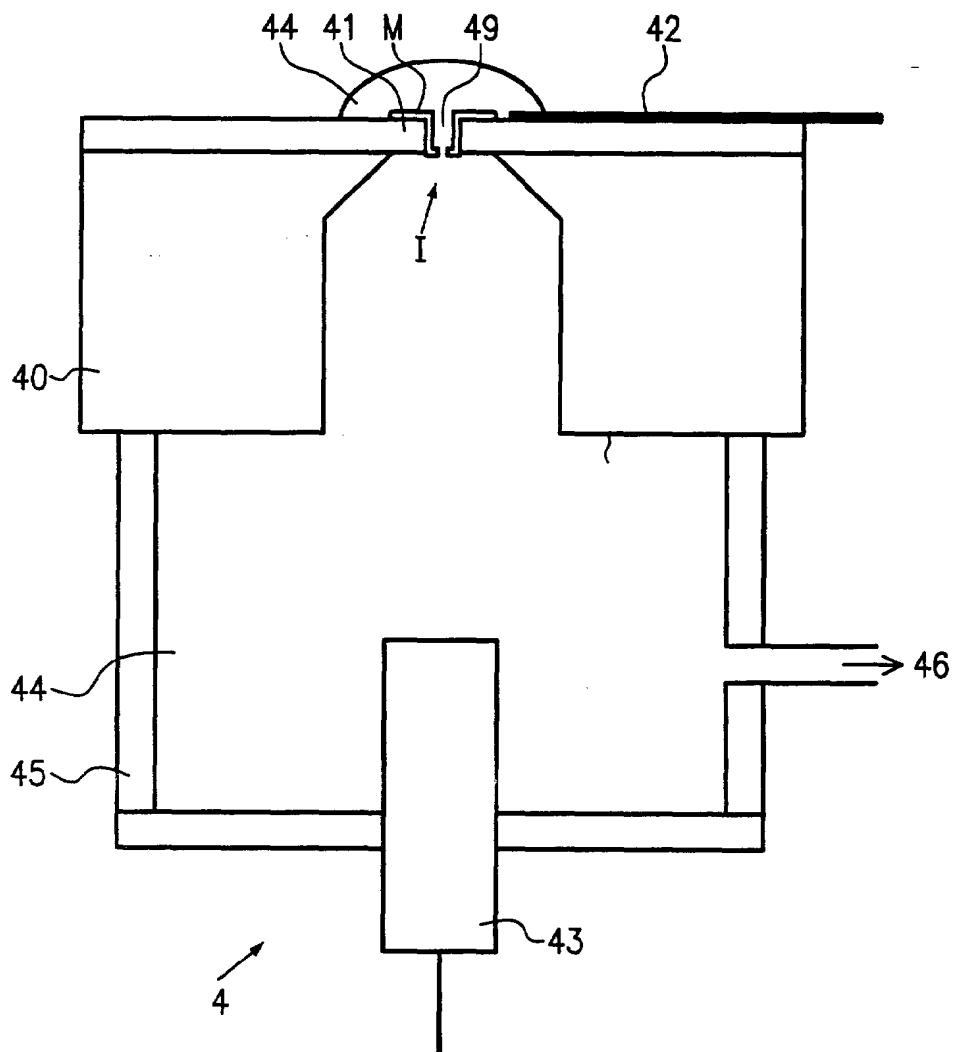


FIG. 4

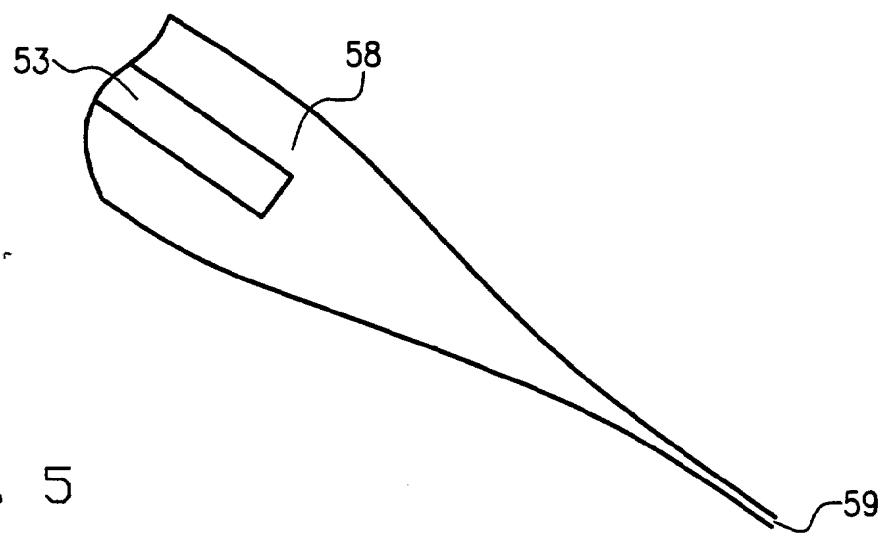


FIG. 5